

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770035

研究課題名(和文)植物の栄養素シグナリングと代謝ネットワークの統合的解析

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of nutrient signaling and metabolism in plants

研究代表者

佐藤 長緒 (Sato, Takeo)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50609724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の成果として、C/N栄養応答制御因子ATL31のリン酸化を検出し、そのリン酸化がユビキチン化標的因子14-3-3タンパク質との結合、植物の成長制御に重要であることを明らかにした。また、新規のC/N応答鍵因子として転写因子FBH4が単離された。FBH4は花成制御および気孔の開閉に重要な転写因子として近年注目されている。今後FBH4の標的遺伝子群を単離することで、C/N応答性の転写制御ネットワークの詳細を明らかになることが期待される。さらに、鍵代謝酵素SPSにも着目し、C/Nストレス環境下では、SPSの特定のセリン残基のリン酸化修飾が低下し、それが糖代謝に影響することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Nutrient availability, in particularly the balance of carbon (C) and nitrogen (N) is one of the most important factors for regulating plant metabolism and development. Our proteomics and biochemical analysis demonstrated that the ATL31 targets 14-3-3 proteins for ubiquitination and regulates the 14-3-3s stabilities in response to C/N status. Furthermore, we revealed that the targeting of ATL31 to 14-3-3 is dependent on phosphorylation of specific Ser/Thr residues in C-terminal region of ATL31. Our proteome and metabolome analysis demonstrated the dynamics of 14-3-3 interactors and regulation of primary metabolism via phosphorylation cascade in response to C/N condition.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物 生理学

キーワード：栄養素応答 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

植物は、生育環境の栄養条件に応じて代謝、成長を巧みに制御しながら生きている。各栄養素の代謝系は相互に影響し合っているが、特に代謝の根幹を担う炭素源(C)と窒素源(N)は、アミノ酸合成をはじめ多くの代謝系で密な関連をもっている。そのため植物は、その相対量比(C/Nバランス)を感知し適応する「C/N応答」能力を有している。窒素欠乏や糖の分配異常などによりC/Nバランスが崩れると植物の発芽後成長が阻害され、さらには花成・老化といった植物ライフサイクルの重要な転換点も影響を受ける(Corruzi and Zhou, Curr. Opin. Plant Biol. 4: 247, 2001)。ただし、その生理学的重要性が指摘される一方で、解析が困難なC/N応答制御の分子機構に関する知見はほとんど得られていなかった。申請者は、C/N応答制御機構の解明を目指し、独自のC/Nストレス条件を用いたスクリーニングを行い、新規のC/N応答異常変異体 *carbon/nitrogen insensitive 1-D (cni1-D)* の単理に成功した。この変異体は、新規のユビキチンリガーゼ ATL31 が過剰発現することで高C/低Nストレスでも発芽後成長が進行し、逆に機能欠損変異体 *at131* ではC/N過剰応答性を示すことが分かった(Sato et al., Plant J. 60: 852, 2009)。更なる解析として、アフィニティー精製とMS解析を駆使したプロテオミクス解析を実施し、ATL31の相互作用因子として14-3-3タンパク質の同定に成功した。その後の生化学・遺伝学的解析による詳細な検討の結果、ATL31はC/Nに応じた14-3-3安定性制御を介して、植物の発芽後成長を制御することが示された(Sato et al., Plant J. 68: 137, 2011, Sato et al, Plant Signal. Behav. . 6: 1465, 2011)。さらに、最近申請者は、これまでのC/N改変培地を用いた発芽後成長の解析から、より生理的条件下でのC/N応答解析に発展させるべく、大気CO₂濃度の変化によるCO₂/N応答解析に取り組んでいる。その結果、野生型植物の老化が高CO₂/低N条件で促進され、さらに *at131* 機能欠損変異体ではより老化が促進され、逆に *ATL31* 過剰発現体では遅延することが示された。また、老化に先駆けて、これらの変異体ではデンプンの蓄積といった炭素・窒素代謝のフローが劇的に変化しており、その結果植物の成長相が栄養成長相から老化(生殖成長相の一環)へと切替わっていることが示唆された。

2. 研究の目的

これまでの解析から、C/N応答制御因子としてATL31と14-3-3タンパク質を単離し、それらは植物の老化制御において重要なことが分かった。

本申請課題では、ATL31・14-3-3の下流でより直接的にC/N栄養応答性の代謝および老化を制御する鍵因子群(酵素・シグナル伝達因子)の同定を目指し、1)14-3-3インタラクトームによるC/N代謝・老化制御鍵因子群の網羅的探索を行う。得られた候補因子について2)リン酸化も含めた14-3-3との相互作用メカニズムとそれが鍵因子の機能および活性制御に与える影響を詳細な生化学的解析で明らかにする。さらに、3)変異体を用いた代謝物および老化進行の解析を行うことで、鍵因子の生理的な機能性について検証する。これらの情報から、14-3-3制御下に広がる栄養素代謝および老化制御分子ネットワークの実態を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)14-3-3インタラクトーム解析によるC/N代謝・老化制御鍵因子群の探索
先端的なプロテオミクス技術を利用した定量的14-3-3相互作用解析を行い、C/Nに応答した代謝・老化制御の鍵となる代謝酵素およびシグナル伝達因子の候補分子を単離する。

(2)鍵因子(酵素・シグナル伝達因子)機能制御メカニズムの解析

C/Nに応答した鍵因子と14-3-3の結合制御メカニズムおよびその活性変動を解析する。

(3)鍵因子の変異体を用いた代謝物変動および老化進行の解析

変異体を用いたC/N応答解析から鍵因子の生理的機能性について明らかにする。

4. 研究成果

本研究で実施したプロテオーム解析結果の1つとして、これまでに申請者が解析を進めてきたC/N応答制御因子ATL31のリン酸化が検出された。さらに、詳細な生化学的・遺伝学的解析の結果、そのリン酸化がユビキチン化標的因子14-3-3タンパク質との結合に重要であり、植物の発芽後成長を制御することが明らかとなった。また、新規のC/N応答鍵因子として転写因子FBH4が単離された。FBH4は花成制御および気孔の開閉に重要な転写因子として近年注目されている。FBH4過剰発現株を用いた解析から、FBH4のC/N応答への関与が確認された。今後FBH4の標的遺伝子群を単離することで、C/N応答性の転写制御ネットワークの詳細を明らかになることが期待される。

さらに、鍵代謝酵素SPSにも着目し、C/N応答における機能に解析を進めた。C/Nストレス環境下では、SPSの特定のセリン残基のリン酸化修飾が低下し、それと同時に14-3-3との結合性が低下することが示された。またメタボローム解析から、C/Nストレス時にはスクロースの蓄積量が増加することも示されており、SPSの翻訳後制御による酵素活性制御が、植物の代謝および成長制御に重要で

ある可能性が示唆された。
今後は上記の転写および代謝の鍵因子に関する解析を進展させることで、C/N 応答と老化制御におけるシグナル伝達・代謝制御の統合的理解につながることを期待される。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計5件)

Yasuda S, Sato T, Maekawa S, Aoyama S, Fukao Y and Yamaguchi J (2014) Phosphorylation of Arabidopsis Ubiquitin Ligase ATL31 Is Critical for Plant C/N-nutrient Response and Controls the Stability of 14-3-3 Proteins. *J Biol Chem*, 査読有, in press, <http://www.jbc.org/content/early/2014/04/10/jbc.M113.533133.long>

Aoyama S, Lu Y, Yamaguchi J and Sato T* (2014) Regulation of senescence under elevated atmospheric CO₂ via ubiquitin modification. *Plant Signal Behav*, 査読有, in press, <https://www.landesbioscience.com/journals/psb/article/28839/>

*Corresponding author

Aoyama S, Huarancca Reyes T, Guglielminetti L, Lu Y, Morita Y, Sato T* and Yamaguchi J. (2014) Ubiquitin ligase ATL31 functions in leaf senescence in response to the balance between atmospheric CO₂ and nitrogen availability in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*, 査読有, 55(2): 293-305. doi: 10.1093/pcp/pcu002.

*Corresponding author

Maekawa S, Inada N, Yasuda S, Fukao Y, Fujiwara M, Sato T and Yamaguchi J (2014) The carbon/nitrogen regulator ARABIDOPSIS TOXICOS EN LEVADURA31 controls papilla formation in response to powdery mildew fungi penetration by interacting with SYNTAXIN OF PLANTS121 in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 査読有, 164(2): 879-887. doi: 10.1104/pp.113.230995.

Sun H, Fukao Y, Ishida S, Yamamoto H, Maekawa S, Fujiwara M, Sato T* and Yamaguchi J. (2013) Proteomics analysis reveals a highly heterogeneous proteasome composition and the post-translational regulation of peptidase activity under pathogen signaling in plants. *J Proteome Res*, 査読有, 12: 5084-5095. doi: 10.1021/pr400630w *Corresponding author

〔学会発表〕(計9件)

佐藤長緒, Yu Lu, 安田盛貴, 草野都, 斉藤和季, 野村有子, 中神弘史, 深尾陽一朗, 山口淳二 (2014) 14-3-3 タンパク質による植物 C/N 応答制御ネットワークの解析, 第55回日本植物生理学会年会, 富山大学, 3月18-20日

Sato T, Aoyama S, Yasuda S, Maekawa S, Fukao Y and Yamaguchi J (2013) UBIQUITIN LIGASE ATL31 REGULATES PLANT GROWTH VIA 14-3-3 DEGRADATION IN RESPONSE TO C/N NUTRIENT CONDITION. Nitrogen 2013, Puerto Varas (Chile), 11月18-22日

Sato T, Yasuda S, Maekawa S, Nomura Y, Nakagami H, Fukao Y and Yamaguchi J (2013) Post-translational regulation of nutrient signaling and metabolism mediated by 14-3-3 proteins in plants. The 12th Human Proteome Organisation World Congress, Yokohama, 9月14-18日

佐藤長緒 (2013) 植物のタンパク質相互作用解析を利用した生理機能解析, シンポジウム, 第31回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム, 北海道大学, 9月10-12日 (招待講演)

Sato T, Aoyama S, Maekawa S, Yasuda S, Fukao Y, Yamaguchi J (2013) Ubiquitin ligase ATL31 targets 14-3-3 proteins to regulate nutrient metabolism in Arabidopsis plants. The 35th Naito Conference on "The Ubiquitin-Proteasome System: From Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles", Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo. 7月9-12日

佐藤長緒, 青山翔紀, 前川修吾, 安田盛貴, 山口淳二 (2013) ユビキチンリガーゼ ATL31 は高 CO₂ 条件下での老化制御に関与する, 第54回日本植物生理学会年会, 岡山大学, 3月21-23日

Sato T (2013) Regulation of Carbon and Nitrogen Metabolism via Post-Translational Modification in Plants, International Symposiumon Japanese Solanaceae Genomics Initiative, Tukuba University, 2月8-9日 (招待講演)

Sato T, Sun H, Maekawa S, Yasuda S, Fujiwara M, Fukao Y, Yamaguchi J (2012) Proteasome transformation in response to pathogen attack, XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Kyoto, Japan, 7月29日-8月2日

Sato T, Lu Y, Maekawa S, Yasuda S, Yamaguchi J (2012) Ubiquitin ligase ATL31 regulates 14-3-3 protein stability in response to C/N nutrient status. 23rd International Conference on Arabidopsis Research, Vienna, Austria, 7月3-7日

〔図書〕(計2件)

佐藤長緒, 山口淳二 (2013) C/N バランス調節による植物の代謝・成長戦略, 化学と生物 (学会出版センター), 51: 763-772.

前川修吾, 佐古香織, 佐藤長緒 (2012) 植物の RING 型ユビキチンリガーゼとプロテアソームの機能, 生化学: 84, 416-424

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.hokudai.ac.jp/~jjyama/keitai2/Welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 長緒 (SATO, Takeo)

北海道大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号: 50609724

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し